

文章编号: 1004 - 7271(2005)02 - 0127 - 06

鲢的性分化及性转技术的初步研究

潘光碧, 邹世平, 邹桂伟, 陈细华, 罗相忠

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 荆州 434000)

摘 要:将繁殖季节顺产出的鲢卵从未受精卵开始到出膜后 45 d 的鱼苗进行连续切片, 观察其性分化。经观察, 鲢苗出膜后 24 d 在腹腔上皮的下方清晰可见性腺原基。出膜后 34 d 则已明显性分化, 雄性生殖嵴之体细胞增殖, 与性细胞一起突向体腔, 以柄状精巢系膜连于腹膜上皮; 雌性生殖嵴之体细胞增殖, 沿腹膜上皮横向伸展。用口服甲基睾丸酮(MT)的方法, 设 3 个梯度(15×10^{-6} 、 30×10^{-6} 、 45×10^{-6})对鲢雌核发育苗进行性转, 结果以出膜后 3~4 d 的鱼苗口服 MT(30×10^{-6}), 连续投喂 50 d, 转雄效果较好, 鱼苗能正常摄食药饵, 成活率可达 79.2%。

关键词:鲢; 性分化; 性转; 口服; 甲基睾丸酮

中图分类号: S 917 文献标识码: A

A preliminary study on sex differentiation and sex reversion techniques in *Hypophthalmichthys molitrix*

PAN Guang-bi, ZOU Shi-ping, ZOU Gui-wei, CHEN Xi-hua, LUO Xiang-zhong

(Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China)

Abstract: Continuous slice observation has been made from unfertilized egg to fry of 34 days after hatching in *Hypophthalmichthys molitrix*. At the age of 24 days after hatching, the primordial gonad was obviously seen below the peritoneal epithetium. The sex differentiation was completed at the age of 34 days. In males, the genital fold containing the proliferating somatic cells, together with the genital cells, protruded into the cavity and was connected with the peritoneal epithetium by a mesorchium. In females, the genital fold with its somatic cells proliferating, extended along the peritoneal epithetium. Exogenous 17 α -Methyltestosterone (MT) treatments by oral administration was tried to induce sex reversion in gynogenetic silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fingerlings with three concentrations (15×10^{-6} , 30×10^{-6} , 45×10^{-6}). The results showed that oral administration for continuous 50 days at the level of 30×10^{-6} was effective for sex reversion (from female to male), and in this treatment, the fish could eat the drug-diet and the survival rate was 79.2%, and that soaking and implantation treatments gained poor effect.

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; sex differentiation; sex reversion; oral administration; 17 α -Methyltestosterone

鲢是我国著名的特产经济鱼类, 养殖历史悠久, 在我国池塘、湖泊、水库均有养殖, 且养殖产量一直居我国淡水养殖之首。具有生长快、养殖成本低、可充分利用水体和调节水质等优点。据刘焕亮¹报

收稿日期: 2004-08-27

基金项目: 国家“九五”攻关资助项目(96-008-01-02-01)

作者简介: 潘光碧(1943-), 女, 重庆市人, 研究员, 主要从事鱼类遗传育种研究。Tel: 0716-8238145

道,鲢的营养价值也较高,其粗蛋白含量(19.6%)和必需氨基酸占氨基酸总量(47.7%)均高于鲤,鲢的 EPA 和 DHA(俗称脑白金)的含量也高于鳙,的确是一个价廉物美的养殖种类。对鲢的选育种工作已引起国家的高度重视,被列在“七五”、“九五”和“十五”国家攻关课题。由于鲢第一次性成熟需 3~4 年,所以按常规方法选育至少需 20 年左右的时间,才能选育出优良品种。为加快选育速度,本课题组采用了雌核发育技术结合性转快速建立纯合系的方法,争取在短期内获得 1~2 个优良品系,因此对鲢的早期性分化和转雄技术的研究十分重要。

1 材料和方法

1.1 试验材料

鲢早期性分化材料取自本所试验场普通鲢的卵。转雄试验所用材料,均为本课题组“九五”期间选育的连续第二代雌核发育鲢鱼苗。其诱导方法见潘光碧^[2]。

1.2 鲢早期性分化的观察

在繁殖期对普通鲢用 HCG、LRH-2 或混合激素 A 型进行正常催产,将顺产出的卵从未受精卵开始到出膜后 45 d 为止,每天取材一次、Bouin 氏液固定、石蜡包埋切片(8 μm 厚)、H. E 染色、显微镜观察、拍照。

1.3 转雄方法及结果观察

在鱼苗出膜 4 d 后,将试验鱼分为 3 组,各 120 尾,设低、中、高(15×10^{-6} 、 30×10^{-6} 、 45×10^{-6})3 个梯度。试验鱼随鱼体增长及时转入相应容器内饲养(从 0.02 m^3 玻璃培养缸 \rightarrow 0.08 m^3 塑料箱 \rightarrow 1.5 m^3 玻璃钢桶 \rightarrow 3 m^3 水泥池)。药饵配制时,将 MT(所用 MT 均为美国进口)先溶于适量的无水酒精中,然后按所需浓度分别拌入鸡蛋黄、红虫粉和白仔鳗饲料中。配制蛋黄时用搅拌器将蛋黄与 MT 搅烂混匀后,再用开水冲成蛋花投喂。仔鳗饲料制成团投放于饲料台上。前 3 d 喂蛋黄,后 4 d 喂红虫粉,以后喂红虫粉加仔鳗饲料和全仔鳗饲料。在转入玻璃钢桶前,试验用水为曝气自来水,以后为经过滤后的池塘水。每天投喂 2~3 次,换水 1~2 次,每次用虹吸管换去约 1/3 的底层水。实验期为 50 d,期间每隔 5 d 各组取样 5~7 尾,Bouin 氏液固定、石蜡包埋切片。试验结束后,将每组鱼剪鳍条作标记,混养在同一池中,待鱼长大后作进一步观察。

2 结果

2.1 鲢早期性分化

经观察,出膜后 24 d,在鳔的腹面两侧,腹腔上皮的下方清晰可见性腺原基——生殖嵴(图版 I -1, 2)。出膜后 34 d,则已明显性分化,雄性生殖嵴之体细胞增殖,与性细胞一起突向体腔,以柄状精巢系膜连于腹膜上皮(图版 I -3,4)。雌性生殖嵴之体细胞增殖,沿腹膜上皮横向伸展(图版 I -5,6)。

2.2 转雄结果

2.2.1 不同剂量下试验苗的成活率

由表 1 可看出,在喂药 1 周内试验苗死亡率最高,尤以低剂量组最甚。喂药 2 周,低剂量组仍有较高死亡率,而中、高两组则已大幅度降到 1.7%。喂药 3 周后,低剂量组成活率明显提高,表现出逐步适应的趋势,而高剂量组死亡率呈现较大反弹。从药物对鱼苗成活率的影响而言,以中剂量(30×10^{-6})为宜。

2.2.2 不同剂量下试验苗的摄食行为

鲢为浮游生物食性,实验中鲢生活水体为经过曝气的自来水和经过滤的池水。试验的前 3 d 鱼体透明,可见摄入的蛋黄。药饵投喂 16 d 后,可见中、低两组鱼苗到食台摄食,高剂量组仍在底层活动。28 d 后,从食台上观察,3 组鱼都已摄食,而以低剂量组摄食多。说明低剂量组适应时间短,摄食量大,

高剂量组适应时间较长,摄食量小。通过切片观察,可见其肠道充塞药饵,说明对鲢这类滤食性鱼类,用投喂药饵的方法进行性转是可行的。

表 1 雌核发育鲢性转口服试验各组鱼的死亡率

Tab.1 Mortality in oral administration trials in gynogenetic silver carp

组别	各阶段仔鱼死亡率(%)			总死亡率(%)
	喂药一周	喂药二周	喂药三周后	
低剂量组	24.2	10.8	1.7	36.7
中剂量组	15.8	1.7	3.3	20.8
高剂量组	12.5	1.7	5.8	20

2.2.3 性转结果

出膜后 15~27 d,即投喂药饵后 11~23 d,生殖嵴仍继续向雌性方向分化,来自腹腔上皮的体细胞和原始生殖细胞分裂增殖,并沿着其背部的腹腔上皮横向伸展(图版 II-1)。投喂药饵后 50 d,观察到部分性腺开始转为雄性,可见着色很深的精索(图版 II-2),这批材料养至第二年 6 月,由于养殖管理方面的客观原因,只抽样检查到 2 尾,结果其中 1 尾中剂量组(30×10^{-6})已转为雄性,切片显示为 I 期精巢(图版 II-3,4),说明该浓度有性转效果;另 1 尾为低剂量组(15×10^{-6})切片显示为卵巢(图版 II-5,6),可能低剂量组无转雄效果。

3 讨论

3.1 关于早期性分化的研究

有学者研究表明,性激素诱导鱼类性反转能力与鱼类发育阶段有密切关系,其性激素效应将随着鱼类性腺的不断分化明显递减^[3]。因此对鱼类早期性分化的研究十分重要,但目前有关鱼类早期性分化的研究报道较少。赵维信等^[4]报道了虹鳟的性腺自然分化规律,从刚出膜的仔鱼开始到 6 周龄的仔鱼,为性腺的未分化时期。6~8 周龄的仔鱼性腺开始分化,组织学观察,如果较大的血管出现在性腺的紧靠生殖系膜的一端,则将来发育成精巢;如果较大的血管位于性腺中部,则将来发育成卵巢。我们的研究表明,鲢的性分化时期较虹鳟早,出膜后 34 d 即已性分化,且雌、雄生殖嵴体细胞增殖的形态与在鲤性腺发生与性别分化的研究中观察到的情形相同,只是鲤性分化时间更早些,在出膜后 20 d 左右就已性分化,对鲤性别诱变的最佳时机是出膜后 5~20 d^[5]。我们的研究结果表明,对鲢进行性别诱变必须在出膜后 34 d 之前。

3.2 对鲢其它性转方法的尝试

我们在对鲢进行口服药物性转的同时,还采用浸泡和埋植的方法进行了尝试,但后者的效果都不理想。尤其浸泡法对鱼苗刺激很大, 10×10^{-6} MT 可致死;对出膜 3~4 d 的鱼苗刺激更大,看来采用此法可能应在出膜后 15~20 d 进行,处理浓度还要适当降低,浸泡方法也应作多种试验,这样仔鱼成活率可能会高些。埋植法在石斑鱼^[6,7]上应用十分成功。这可能与它具有先雌后雄性逆转,雌雄同体的特性,而且埋植时个体较大有关。对于鲢,由于要在出膜后 34 d 前进行手术,所以应在一个月内尽快将鱼培育到 15 cm 以上才便于手术,而且培育时间长了,正值夏季到来,气温升高不利于手术,所以出膜后的培育十分重要。

3.3 与其它鱼类口服 MT 性转效果的比较

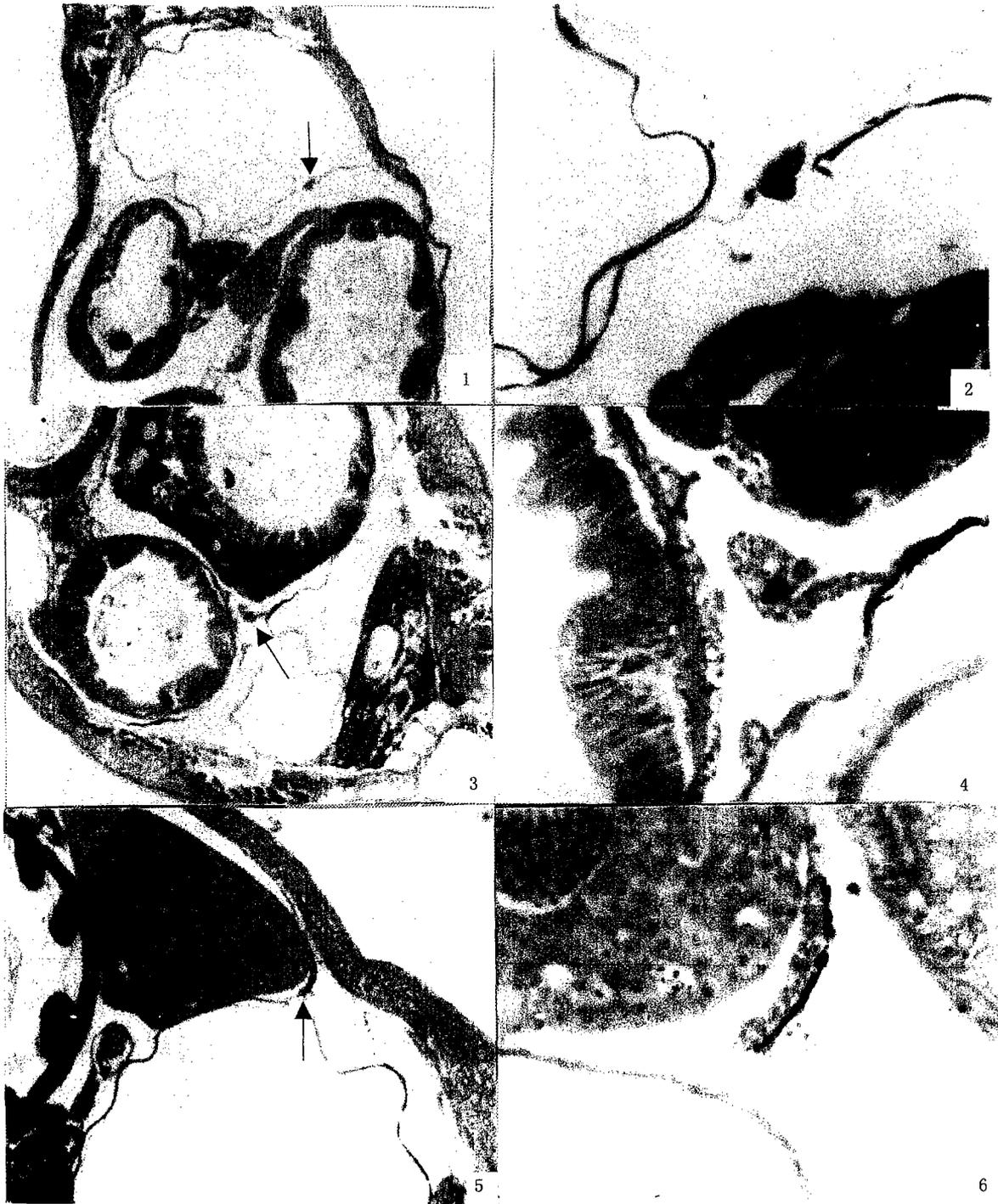
口服 MT 进行性转诱变,在罗非鱼、鲤、鲫和虹鳟等鱼类都取得了很好的效果。投喂的最适浓度因鱼而异,且与药物效价、投喂的起始时间和投喂次数有关。林浩然和林鼎^[4]处理刚离开雌鱼口腔的罗非

①王瑞霞,楼允东. 鲤鱼性腺发生与性别分化的研究.“八五”农业部生物技术项目(85 农-11-04-03)执行情况报告和上海水产大学组织胚胎教研室讲义。

鱼仔鱼,以 60×10^{-6} 为最好,转雄率达 100%, 30×10^{-6} 时的转雄率为 81% ~ 85%;而处理离开雌鱼口腔 10 多天的仔鱼, 30×10^{-6} 组效果不明显, 60×10^{-6} 没效果。魏于生等^[3]报道,以 30×10^{-6} 效果较好,转雄率达 97%。而李家乐等^[8]报道以 20×10^{-6} 时转雄率可达 100%, 10×10^{-6} 时转雄率也达 93.5%。这一有效剂量比 Jalabert 等^[9]、Tayamen 和 Shelton^[10] 的 30×10^{-6} ~ 60×10^{-6} 要低,与 Jo 等^[11] 的 10×10^{-6} ~ 25×10^{-6} 相似。这可能与他们投喂次数多(一天 4 次)有关。陈本德^[12]报道,鲫以 25×10^{-6} ~ 30×10^{-6} 效果最好, 50×10^{-6} ~ 100×10^{-6} 反而没有雄鱼出现。我们的试验表明对鲢鱼性转采用口服法也是行之有效且简便易行的。处理的起始时间以出膜后 3 ~ 4 d 即鱼苗刚开口摄食较好,这样易于驯化,且性转效果较好,处理浓度以 30×10^{-6} 为宜。

参考文献:

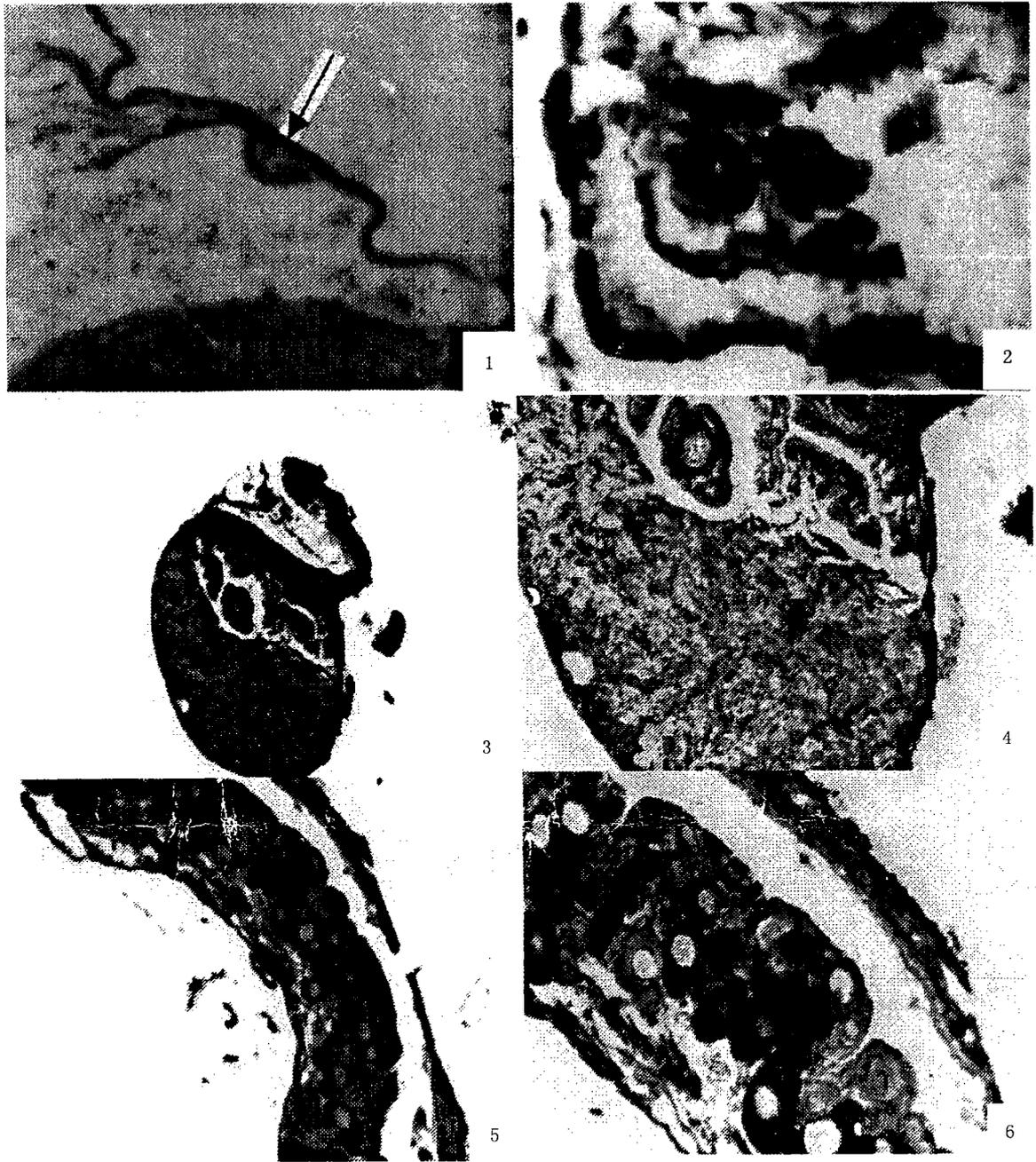
- [1] 刘焕亮.我国主要水产品营养成分的研究[J].科学养鱼,2000,7:11-12.
- [2] 潘光碧.人工诱导鱼类雌核发育技术的研究[J].淡水渔业,1988,6:17-20.
- [3] 林浩然,林鼎.用雄性激素诱导罗非鱼雌性化的试验[J].动物学杂志,1979,1:1-3.
- [4] 赵维信,谈毅奇,彭士兵. 17α -甲基睾酮诱导虹鳟性转化[J].淡水渔业,1991,1:3-5.
- [5] 楼允东.组织胚胎学[M].北京:中国农业出版社,1996.
- [6] 杨家驹,黄增岳,肖耀兴,等.人工诱导巨石斑鱼性逆转的研究[J].热带海洋,1996,15(4):75-79.
- [7] 邹记兴,陶友宝,向文洲,等.人工诱导点带石斑鱼性逆转的组织学证据及其机制探讨[J].高技术通讯,2003,6:81-86.
- [8] 李家乐,李思发,韩风进.甲基睾酮诱导吉富品系尼罗非鲫雄性化的研究[J].水产学报,1997,21(增刊):107-110.
- [9] Jalabert B, Moreau J P, Billard R. Determinism de sexe chez *Tilapia macrochir* et *T. Nilotica*: action de la méthyltestotérone dans l'alimentation des alevins sur la différenciation sexuelle; proportion des sexes dans la descendance des males "inverses"[J]. Ann Biol Anim Biochim Biophys, 1974, 14:729-739.
- [10] Tayamen M M, Shelton W L. Inducement of sex reversal in *Sarotherodon niloticus* (Linnaeus)[J]. Aquac, 1978, 14:349-354.
- [11] Jo J Y, Smitherman O, Tave D. Effects of six levels of dietary 17α -Methyltestosterone on sex reversal and growth of *Oreochromis aureus* (Stenindachner) and *O. niloticus* (Linnaeus) [J]. J Aquac, 1995, 8:77-83.
- [12] 陈本德.甲基睾酮诱导鲫鱼雌核发育子代性转化的研究[J].水产学报,1982,6(2):147-151.



图版 I 鲢早期性分化

Plate I The sex differentiation in silver carp

1、2 示出膜后 24 d 的性腺原基 $\times 40, \times 200$; 3、4 示雄性生殖嵴(出膜后 34 d); $\times 40, \times 200$; 5、6 示雌性生殖嵴(出膜后 34 d); $\times 40, \times 200$



图版 II 口服 MT 转雄实验

Plate II Sex reversion (from female to male) in fingerlings by oral administratstion

1. 示喂药 15 d 的原始生殖细胞 ($\times 200$); 2. 示喂药 50 d 后的精索 ($\times 200$); 3. 示雌核发育鲢中剂量组转雄鱼 (I 龄鱼早期精巢, $\times 40$);
4. 示 I 龄鱼早期精巢 ($\times 100$); 5. 示雌核发育鲢低剂量组性转雄鱼切片 (I 龄鱼 II 期精巢, $\times 40$); 6. 示 I 龄鱼 II 期精巢 ($\times 100$)